

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
27. März 2003 (27.03.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 03/025568 A2

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/53

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/10318

(22) Internationales Anmeldedatum:  
13. September 2002 (13.09.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 45 384.1 14. September 2001 (14.09.2001) DE  
101 51 051.9 16. Oktober 2001 (16.10.2001) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: ZEIDLER, Reinhard [DE/DE]; Rainerstrasse  
4a, 82178 Puchheim (DE).

(74) Anwalt: BEHNISCH, Werner; Reinhard, Skuhra, Weise,  
& Partner GbR, Friedrichstrasse 31, 80801 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: IDENTIFICATION OF ANTIGENS BY XENOGENIC, ALLOGENIC OR AUTOLOGOUS ANTIBODY-MEDIATED  
PRECIPITATION

A2 (54) Bezeichnung: IDENTIFIZIERUNG VON ANTIGENEN DURCH XENOGENE, ALLOGENE ODER AUTOLOGE ANTI-  
KÖRPER-VERMITTELTE PRÄZIPITATION

WO 03/025568 A2 (57) Abstract: The invention relates to a method for identifying antigens that are associated with diseases, in which a humoral  
immune response occurs and specific antibodies are formed. The method is based on the autologous, allogenic or xenogenic  
antibody-mediated precipitation of antigens from cell lysates or bacterial, parasitic and/or viral preparations comprising autologous,  
allogenic or xenogenic serums, ascites or pleural fluids.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Identifizierung von Antigenen, die mit Krank-  
heiten assoziiert sind, bei denen es zur Ausbildung einer humoralen Immunantwort und damit zur Bildung spezifischer Antikörper  
kommt. Das Verfahren basiert auf der durch autologe, allogene oder xenogene Antikörper vermittelten Präzipitation von Antigenen  
aus Zelllysaten oder Bakterien-, Parasiten- und/oder Virenpräparaten mit autologen, allopathen und/oder xenogenen Seren, Aszites  
oder Pleuralflüssigkeiten.

**Identifizierung von Antigenen durch**  
**xenogene, allogene oder autologe Antikörper-vermittelte Präzipitation**

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren (hier AMIDA genannt, für antibody-mediated Identification of antigens) zur Identifizierung von Antigenen, die mit Krankheiten assoziiert sind, bei denen es zur Ausbildung einer humoralen Immunantwort und damit zur Bildung spezifischer Antikörper kommt. Dieses Verfahren basiert auf der durch autologe, allogene oder xenogene Antikörper vermittelten Präzipitation von Antigenen aus Zelllysaten oder Bakterien-, Parasiten- und/oder Virenpräparaten mit autologen, allogenen und/oder xenogenen Seren, Aszites oder Pleuralflüssigkeiten. Die Induktion einer Immunantwort, die einher geht mit der Produktion von Antikörpern, ist somit die einzige Grundvoraussetzung für die Anwendung von AMIDA. Das Verfahren eignet sich somit insbesondere zur Identifizierung von Tumorantigenen, aber auch für solche Antigene, die mit Autoimmunkrankheiten oder bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen assoziiert sind.

Unter dem Begriff „Antigene“, wie er in dieser Beschreibung verwendet wird, sind Strukturen zu verstehen, gegen die ein Organismus Antikörper bildet, da sie seinem Immunsystem fremd sind. Die Kenntnis von möglichst spezifischen Antigenen ist eine wichtige Voraussetzung für die Diagnose und die Immuntherapie von Tumorpatienten und Personen, die z.B. an einer Autoimmunkrankheit oder einer chronischen Infektion leiden. Derartige Antigene, die für die jeweilige Krankheit mehr oder minder spezifisch sind, ermöglichen den Nachweis und das Targeting in vivo und in vitro von Tumorzellen, von Zellen, die Ziel einer Autoimmunreaktion sind, sowie auch von infizierten Zellen und infektiösen Organismen. In der vorliegenden Anmeldung wird ein Verfahren zur Isolierung und Identifizierung von Antigenen, die Ziele einer humoralen Immunantwort sind, beschrieben.

Das Targeting von Zellen in vivo und in vitro mit immunologischen Werkzeugen wie T-Zellen und Antikörpern ist sehr stark von der Kenntnis von möglichst spezifischen Proteinen auf

Zielzellen abhängig. Seit einigen Jahren werden folglich umfassende Bemühungen unternommen, um spezifische Antigene – beispielsweise tumorspezifische Antigene – zu identifizieren und zu charakterisieren. Dies geschah und geschieht vorzugsweise über die Analyse des Repertoires an spezifischen T-Zellen (=zelluläre Immunantwort). Die Rolle und die Qualität der humoralen Immunreaktion gegenüber z.B. Tumoren steht dem gegenüber noch am Anfang seiner Erforschung. Diese basiert weitestgehend auf neueren Techniken, die das molekulare Klonieren solcher Tumorantigene ermöglichen, die Targets für eine humorale Antwort sind, also gegen die Antikörper gebildet wurden.

Die Existenz von tumorspezifischen Antikörpern bei Krebspatienten ist für bekannte Antigene wie p53 und HER-2/neu ausführlich beschrieben worden. Die Isolierung neuer Antigene unter Verwendung von autologen oder allogenen Antikörpern hat sich in erster Linie durch Anwendung der SEREX-Technologie (Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries; veröffentlicht in: "Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host" Ugur Sahin et al, PNAS Vol 92 pp 11810-11813 Dec. 1995) ergeben. Pfreundschuh und Kollegen demonstrierten damit indirekt, dass Tumore die Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen auslösen, was wiederum die Aktivierung von Antigen-spezifischen B-Zellen und die Produktion von Antikörpern nach sich zieht. Tumor-spezifische Antikörper sind adäquate Werkzeuge zur Isolierung der von ihnen erkannten Antigene. Bekannte Antigene wie MAGE-1 und Tyrosinase wurden durch SEREX kloniert. Zusätzlich konnten völlig neue Antigene identifiziert werden, wobei das bekannteste NY-ESO-1 ist, dessen Expression in gesundem Gewebe auf Testes und Ovar beschränkt ist, das jedoch bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen, wie beispielsweise dem Melanom, aber auch auf Brust-, Blasen-, Prostata- und Leberzell-Karzinomen, exprimiert wird.

Die SEREX-Technologie umfasst die folgenden Schritte:

1. Erstellen einer cDNA - Bank aus einer Tumorbiopsie und Klonierung in einen  $\lambda$ -ZAP-Vektor;
2. Infektion von geeigneten E.coli - Bakterien und Expression der klonierten cDNAs in diesen Bakterien;
3. Übertragen der rekombinanten E.coli - Bakterien auf Nitrozellulose-Membranen und Screenen der Kolonien mit autologen Seren;

4. Nachweis von gebundenen Antikörpern mit einem anti-IgG-Antikörper;
5. Amplifizierung entsprechender Kolonien, Isolierung der darin enthaltenen Plasmide;
6. Sequenzierung und dadurch Identifizierung der darin enthaltenen cDNA.

Die Hauptnachteile des SEREX-Verfahrens bestehen darin, dass es sehr zeitaufwändig und technisch-methodisch kompliziert ist. Der Bearbeitungszeitraum für eine einzige Tumorbioptie kann somit leicht bis zu sechs Monate betragen. Ein weiteres Problem von SEREX stellt die heterologe Expression der aus den Tumorbiospien gewonnenen cDNAs in E.coli dar: Da posttranslationale Modifikationen wie Glykosilierungen, die für die Erkennung von Antigenen durch Antikörper essentiell sein können, in Bakterien nicht oder unterschiedlich ablaufen, ist die Erkennung von Antigenen durchaus nicht gewährleistet. Daneben stellen natürlich auch die verschiedenen Schritte der reversen Transkription, Klonierung und Transkription potentielle Fehlerquellen dar, so dass SEREX insgesamt eine Technologie darstellt, die ein gewisses Potential besitzt, dabei aber fehleranfällig und zeitaufwändig ist.

Es ist folglich die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes und vereinfachtes Verfahren zur Isolierung bzw. Identifizierung von Antigenen bereitzustellen, das direkt, einfach und in vergleichsweise sehr kurzer Zeit durchführbar ist.

Diese Aufgabe wird durch die im Anspruch 1 angegebenen Merkmale gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist eine effektive Methode zur Isolierung und Identifizierung von Antigenen und arbeitet mit einem speziesspezifischen, xenogenen oder autologen System durch Verwendung von Antikörpern aus Serum, Aszites und/oder Pleuralflüssigkeit. Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind vielfältig: Zuerst beruht das System nicht auf der Fremdexpression von cDNAs in bakteriellen oder eukaryotischen Empfängerzellen, sondern ermöglicht vielmehr ein unmittelbares Screening im nativen Kontext, das heißt in Tumorzellen, in erkrankten Geweben oder in Bakterien, Viren oder Parasiten selbst. Dies ist von spezieller Bedeutung, da die ektopische Expression von Antigenen in unverwandten eukaryotischen Empfängerzellen oder Bakterien die tatsächliche Situation in den Spenderzellen (z.B. Zellen eines Primärtumors) nicht adäquat nachahmt. So können sich posttranslationale Modifikationen, wie Glykosilierung, in Abhängigkeit vom Expressions-

system unterscheiden und kommen bei Bakterien überhaupt nicht vor. Glykosilierungen können für die Erkennung von Antigenen aber essentiell sein.

Weiterhin kann das erfindungsgemäße Verfahren als high-throughput und semi-automatisierte Technik etabliert werden, was die Untersuchung von Materialien aus mehreren Patienten parallel ermöglicht. Das Verfahren ist schnell, und es ist realistisch, ein Tumor-assoziiertes Protein innerhalb eines vergleichsweise sehr kurzen Zeitraums von ca. 1-2 Wochen zu isolieren und vollständig zu identifizieren.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist bei der Untersuchung einer Vielzahl von Antigenen geeignet: In erster Linie von Tumorantigenen, jedoch weiterhin auch von Antigenen, die mit Autoimmunkrankheiten, sowie bakteriellen, parasitären oder viralen Infektionen assoziiert sind.

Neben der Identifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen, eignet sich die Technik auch beispielsweise zur Untersuchung von Antigenen, die an Autoimmunerkrankungen beteiligt sind. Auch hier sind die Proteine und Strukturen, die Ziel der Autoimmunreaktion sind, oftmals nicht bekannt. In den meisten Fällen konnte zwar die Erkennung bestimmter Autoantigene durch spezifische T-Zellen demonstriert werden, die Rolle von B-Zellen und Antikörpern ist bei derartigen Erkrankungen in den meisten Fällen aber nach wie vor unbekannt. Somit kann die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens auch bei Autoimmunerkrankungen tiefere Einsichten in einige Krankheitsbilder ermöglichen.

Es ist daher auch möglich, das erfindungsgemäße Verfahren bei chronischen Krankheiten, die durch ein bekanntes pathogenes Agens verursacht werden, anzuwenden. Dabei kann Gewebe eines erkrankten Patienten, aber auch ein Tiermodell mit unterschiedlichen Mausstämmen angewendet werden. Mausstämmen, die gegenüber einer speziellen bakteriellen Infektion resistent bzw. nicht-resistent sind, dienen dabei der Charakterisierung der humoralen Reaktion, die für den Schutz vor dem Pathogen bei dem resistenten Mausstamm verantwortlich ist. Die Anwendung von humanem Gewebe erlaubt die Überprüfung der aus den Tiermodellen gewonnenen Ergebnisse/Antigene und damit die Identifikation von therapeutisch interessanten Antigenen. Auch die Infektion mit verschiedenen Parasiten (z.B. Plasmodien) oder Viren (z.B. die Familie der Herpesviren) führt zu einer Immunreaktion, in deren Ver-

lauf es zur Bildung spezifischer Antikörper kommt. Auch bei solchen Erkrankungen kann somit das erfindungsgemäße Verfahren angewendet werden, um neue Antigene zu identifizieren und somit die Therapie zu verbessern.

Einmal isoliert und charakterisiert, können Tumorantigene, Autoantigene und immunogene bakterielle, parasitäre oder virale Proteine vielfach verwendet werden: (i) Dendritische Zellen oder B-Zellen können damit beladen und so zur Aktivierung spezifischer T-Zellen verwendet werden. (ii) Es lassen sich monoklonale und bispezifische Antikörper herstellen, die für die Diagnose einer Erkrankung und die Therapie von Patienten von großem Nutzen sind. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt somit ein neues und viel versprechendes Werkzeug zur Untersuchung der humoralen Reaktion von Patienten bei einer Vielzahl von Erkrankungen dar und kann zur Entwicklung neuer Therapien dieser Erkrankungen einen entscheidenden Beitrag leisten.

Das erfindungsgemäße Verfahren zum Auffinden von Antigenen umfasst die folgenden Schritte:

Zunächst wird von einem Spender ein Biopsat des Gewebes von Interesse gewonnen und daraus ein Proteinlysate hergestellt; werden Kulturen von Bakterien, Parasiten oder Viren verwendet, so werden diese ebenfalls lysiert. Das Proteinlysate wird dann mit allogenem, xenogenem und/oder autologem Serum, Aszites und/oder Pleuralflüssigkeit inkubiert, die jeweils Antikörper enthalten, die auf eine humorale Immunantwort oder eine Autoimmunantwort auf die Antigene gebildet wurden, um eine spezifische Bindung der Antikörper an die von ihnen erkannten Antigene im Proteinlysate zu erzielen. Danach erfolgt ein Abtrennen der Antigen-Antikörper-Komplexe sowie die Identifizierung der spezifisch an die Antikörper gebundenen Antigene durch geeignete Methoden.

Unter dem Begriff Antigen, wie er in der vorliegenden Anmeldung verwendet wird, wird jede Substanz oder Struktur verstanden, mit der Antikörper spezifisch reagieren können. Im vorliegenden Zusammenhang wird unter Antigen insbesondere eine Substanz oder Struktur verstanden, nach deren Erkennen der Wirbeltierorganismus mit einer Immunantwort reagiert. Im Kontext der vorliegenden Erfindung bedeutet Antigen insbesondere ein Tumoranti-

gen bzw. ein Zielantigen der humoralen Immunantwort, das mit Autoimmunkrankheiten und Infektionen – sowohl bakteriellen als auch viralen oder parasitären – assoziiert ist.

Der Begriff „autolog“ bedeutet, dass der Spender des zu untersuchenden Zellmaterials und der Spender des Antikörper-enthaltenden Serums identisch sind.

Der Begriff „allogen“ bedeutet, dass der Spender des zu untersuchenden Zellmaterials und der Spender des Antikörper-enthaltenden Serums nicht identisch, sondern genetisch differentiell sind, beide jedoch derselben Spezies angehören.

Der Begriff „xenogen“ bedeutet, dass der Spender des zu untersuchenden Zellmaterials und der Spender des Antikörper-enthaltenden Serums nicht identisch sind und nicht derselben Spezies angehören.

Obwohl es sich bei dem autologen System um das in der vorliegenden Erfindung bevorzugte System handelt, können auch allogene oder xenogene Antikörper enthaltende Seren, Aszites und/oder Pleuralflüssigkeit eingesetzt werden. Viele Antigene, insbesondere Tumormarker, die Spezies-spezifisch auftreten, können auf diese Weise identifiziert werden, ohne unabhängig auf autologes Spenderserum angewiesen zu sein. Eine xenogene Anwendung dieses Verfahrens stellt beispielsweise die Inkubation eines Bakterien- oder Virenlysats mit Seren infizierter Wirtsorganismen dar.

Unter dem Begriff Serum ist die flüssige Phase von gewonnenem Blut zu verstehen, die lösliche Antikörper und andere lösliche Serumproteine enthält.

Als Spender wird im Kontext der vorliegenden Erfindung ein Individuum verstanden, bei dem durch das erfindungsgemäße Verfahren Antigene mittels in xenogenen, allogen oder autologen Seren, Aszites oder Pleuralflüssigkeit enthaltenen Antikörper aufgefunden werden sollen. Hierunter sind in erster Linie Säugetiere und Menschen, aber auch infektiöse Organismen, Mikroorganismen oder Zelllinien zu verstehen.

Unter Autoimmunkrankheiten werden Autoaggressionskrankheiten verstanden, bei denen im Laufe einer Immunantwort T-Zellen und Antikörper gebildet werden, die gegen körpereige-

ne Substanzen (Autoantigene) gerichtet sind. Beispiele für Autoimmunkrankheiten sind z.B. Hashimoto-Tyreoiditis, Perniziöse Anämie, chronische Gastritis, Addison-Krankheit, Systemischer Lupus erythematoses, Multiple Sklerose, und viele andere. Bei diesen, wie auch den vorgenannten bakteriellen, parasitären und viralen Infektionen, wird das erfindungsgemäße Verfahren dann angewendet, wenn die Zielantigene der humoralen Antwort nicht ausreichend bekannt und erforscht sind.

Gemäß einer Ausführungsform werden im Schritt des Inkubierens des Proteinlysats mit Antikörper enthaltendem autologem, allogenen oder xenogenem Serum, Aszites oder Pleuralflüssigkeit zusätzlich Antikörper zugegeben, die gegen Immunglobuline des Spenders, beispielsweise der Subklasse IgG, gerichtet sind. Diese zusätzlich zugegebenen Antikörper sind an ein Trägermaterial gekoppelt und dienen so als Brücke zwischen diesem Trägermaterial (beispielsweise Sepharose) und den im Serum enthaltenen Antikörpern. Damit kann (falls gewollt) eine gewünschte Antikörpersubklasse spezifisch an das Trägermaterial gebunden werden. Durch diesen Schritt wird eine weitere Spezifität in diese Technologie eingeführt.

Ein Proteinlysats gemäß der vorliegenden Erfindung kann wie folgt hergestellt werden: Zellen werden mittels Detergenzien (beispielsweise Triton-X100 oder NP40) lysiert, d.h. die Zellmembranen werden vollständig aufgeschlossen. Anschließend werden die unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert, während sich viele Proteine in Lösung befinden.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform wird das Proteinlysats vor dem Inkubationsschritt fraktioniert. Diese Fraktionierung kann beispielsweise eine Auftrennung in Membrananteile und Zytoplasmaanteile umfassen. Für die weitere Durchführung des Verfahrens sind dann beide Fraktionen getrennt einsetzbar. Fraktionierungen ermöglichen eine weitere Spezifizierung der isolierten Antigene und eine vereinfachte technische Durchführung, da weniger Antigene aufzutrennen sind. Zum selben Zweck können Fraktionierungen auch dazu verwendet werden, um einzelne zelluläre Kompartimente anzureichern. Alternativ zur Zentrifugation kann eine Fraktionierung nach Proteingröße auch mittels Ausschlußsäulen erfolgen.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Antikörper sind vorzugsweise an ein Trägermaterial gebunden. Dies gilt sowohl für die im Inkubationsschritt eingesetzten, im autologen/allogenen/



xenogenen Serum, Aszites oder Pleuralflüssigkeit enthaltenen Antikörper, als auch für die gegebenenfalls zusätzlich eingesetzten Antikörper, die gegen Immunglobuline des Spenders gerichtet sind. Die Bindung an ein Trägermaterial ermöglicht die spätere Abtrennung der Antigen-Antikörper-Komplexe über Zentrifugation, wenn etwa Sepharose-Perlen mit den Antikörpern beschichtet sind und aufgrund ihrer Dichte nach unten sinken. Als Trägermaterialien sind Sepharose, Sepharose Protein A, Sepharose Protein G, Agarose Protein A, oder Agarose Protein G einsetzbar.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das Proteinlysate mit dem Trägermaterial vorinkubiert. Dadurch können solche Proteine aus dem Lysat entfernt werden, die unspezifisch an das Trägermaterial binden und im Folgenden die Analyse erschweren würden.

Gemäß eines weiteren Aspektes der vorliegenden Erfindung sind die Antikörper kovalent an das Trägermaterial gebunden. Eine kovalente Bindung erfolgt im Allgemeinen durch Amidbindungen zwischen Amino- und Carboxylgruppen der Proteine oder durch die Bildung von Disulfidbrücken aus jeweils zwei SH-Gruppen. Als Reagenzien finden hier beispielsweise Difluordinitrobenzol, Bromcyan, Formaldehyd, Glutaraldehyd, Hydroxysuccinimidester und Imidate Anwendung. Als Imidat wird vorzugsweise Dimethylpimelimidat eingesetzt. Angaben zur kovalenten Bindung von Antikörpern an eine Matrix mittels Dimethylpimelimidat sind zu finden in: *A one step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix*. The Journal of Biological Chemistry, Bd. 257, Nr. 18, Ausgabe vom 25.9.1982, S. 10766-69. Bezüglich weiterer Angaben zur Bindung mit Hilfe von Bromcyan wird auf: *Bioanalytik, F.Lottspeich und H. Zorbas. Spektrum Lehrbuch*, verwiesen.

Wie bereits oben angesprochen, kann die Abtrennung der Antigen-Antikörper-Komplexe im Falle der Bindung der Antikörper an ein Trägermaterial mittels Zentrifugation erfolgen. Eine Abtrennung der Antikörper-Antigen-Komplexe, die sich bei der Inkubation von Lysaten mit Serum ausbilden, kann alternativ auch über Protein A- bzw. Protein G-beschichtete Säulen erfolgen. Allgemeine Angaben zur Immunpräzipitation sind in der oben genannten Veröffentlichung (Journal of Biological Chemistry) sowie in *Purification of anti-thyroglobulin IgG from human serum*. Clin. Chem. Lab. Med. 2000 Jul. 38 (7), S. 597 – 602, zu finden.

Der letzte Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens, der Nachweis der mit den Antikörpern spezifisch gebundenen Antigene, umfasst vorzugsweise das Auftrennen der abgetrennten Komplexe durch elektrophoretische Methoden. Vorzugsweise findet hier eine zweidimensionale Elektrophorese Anwendung. Dabei werden die Proteine zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt in einem immobilisierten pH-Gradienten und anschließend nach ihrer Größe in einem konventionellen SDS-PAGE aufgetrennt (Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. "The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients." Electrophoresis 2000 Apr;21(6):1037-53).

Unter Elektrophorese wird im vorliegenden Zusammenhang der Transport geladener Teilchen unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes als eine Funktion ihrer Form, Größe und Ladung, sowie von Temperatur, Viskosität und Feldstärke verstanden. Als Träger für die Elektrophorese kommen bevorzugt Gele, wie Polyacrylamid zum Einsatz.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung mit Farbstoffen wie beispielsweise Coomassie-Blau, Silber, Ponceau-Rot oder mit fluoreszierenden oder lumineszierenden Reagenzien behandelt.

Weiterhin ist erfindungsgemäß vorgesehen, dass nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung die interessierenden Proteine, beispielsweise Protein-Spots oder -Banden, ausgeschnitten, einem Protease-Verdau (bspw. Trypsin) unterzogen und mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Die interessierenden Proteine können ebenfalls ausgeschnitten werden, einem Protease-Verdau unterzogen und beispielsweise durch klassische Verfahren wie den Edman-Abbau sequenziert werden.

Die Massenspektrometrie erfolgt beispielsweise mittels MALDI-ToF-Spektrometer (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/Time of Flight), wobei aber u.a. auch ESI (Electrospray Ionisation, auch als nanoscale ESI), EI (Elektronenstoß-Ionisation, Quadrupol), CI (chemische Ionisation) und FAB (fast atom bombardment) verwendet werden können.

Alternativ können Proteine radioaktiv markiert werden, wie dies durch die Zugabe von  $^{35}\text{S}$ -Methionin oder  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ ATP bereits vor der Lyse oder durch eine nachträgliche Jodierung von Proteinen geschieht. Dadurch sind diese Proteine markiert und können nach elektrophoreti-

scher Auftrennung mit Hilfe eines Röntgenfilmes oder eines anderen geeigneten Verfahrens visualisiert werden.

Gemäß eines weiteren Aspekts der Erfindung werden die Proteine nach der Elektrophorese auf eine Nitrocellulose- oder eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membrane übertragen. Diese Proteine werden dann durch Färbung detektiert und anschließend von der Membran isoliert.

Vorzugsweise werden die durch dieses Verfahren identifizierten spezifischen Antigene mit geeignete Kontrollen verglichen: Solche Kontrollen sind insbesondere Lysate aus gesundem Zellmaterial desselben Spenders und/oder die Analyse des Serums selbst. Diese Probe ist zusätzlich zur Erfassung von Serumproteinen interessant, die spezifisch bei Tumorpatienten im Serum vorhanden sind.

Als Spender des Materials zur Herstellung von Protein-haltigen Lysaten kommen Säugetiere, insbesondere Mensch, Primat und Nagetiere, aber auch infektiöse Organismen wie Parasiten, Bakterien und Viren in Frage. Als Spender von autologen/allogenen/xenogenen Seren, Aszites oder Pleuralflüssigkeiten kommen Säugetiere, insbesondere Menschen, Primaten und Nagetiere, wie etwa Maus, Ratte, Hamster oder Kaninchen zum Einsatz.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Zeichnungen sowie die Beispiele näher beschrieben. Es versteht sich, dass diese nur zu Veranschaulichungszwecken vorgesehen sind und der Gegenstand der Erfindung nicht auf die hier dargestellten Aspekte beschränkt ist.

In den Abbildungen zeigen:

**Figur 1:** Eine durchflußzytometrische Analyse (=FACS-Analyse) der humoralen Reaktion eines Karzinom-Patienten (GHD-1) nach der adjuvanten Immuntherapie mit einem bispezifischen Antikörper (BiUII). GHD-1 Lymphozyten (A), Monozyten (B) und Tumorzellen (C) wurden mit den autologen Seren vor oder nach BiUII-Therapie inkubiert. Gebundene Antikörper wurden unter Verwendung eines menschlichen IgG3-spezifischen sekundären PE-konjugierten Antikörpers nachgewiesen. Die BiUII-Therapie hatte eine starke Induktion von

Antikörpern zur Folge, die spezifisch an GHD-1 Tumorzellen, nicht aber an Lymphozyten und Monozyten banden. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von dreien.

**Figur 2:** Ein Schema der AMIDA Screening Technologie.

**Figur 3:** Eine FACS-Analyse der CK8-Expression von Karzinomzelllinien. A.) GHD-1 Tumorzellen wurden entweder unbehandelt (also nicht- permeabilisiert) oder permeabilisiert mit dem CK8 spezifischen Antikörper 1E8 in Kombination mit einem FITC-markierten sekundären Antikörper gefärbt. B.) Die angezeigten nicht-permeabilisierten Zelllinien wurden mit dem CK8 spezifischen Antikörper 1E8 in Kombination mit einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper gefärbt. Bei allen Experimenten wurden tote Zellen gemäß ihrer Propidiumjodidaufnahme abgegrenzt und von der Analyse ausgeschlossen (außer 3A, permeabilisierte Zellen). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von dreien.

**Figur 4:** Eine Immunfärbung von CK8 auf Karzinomzelllinien. A.) Zytospins der Karzinomzelllinien FaDu und PCI-1 wurden mit einem CK8 spezifischen Antikörper in Kombination mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper angefärbt. B.) gleich A.), außer dass ein FITC-konjugierter sekundärer Antikörper verwendet wurde (grün). Zusätzlich wurde die zelluläre DNA mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffes Bis-Benzamidin angefärbt (blau). Ein repräsentatives Experiment von dreien ist dargestellt.

**Figur 5:** Eine FACS-Analyse der CK8 Expression auf primären Karzinomzellen. A.) Einzelzellsuspensionen von Karzinombiopsien des Kopfes-Hals-Bereiches wurden erzeugt und mit CK8- oder EpCAM-spezifischen Antikörpern in Kombination mit einem sekundären FITC-konjugierten Antikörper gefärbt. Die Zellen wurden gemäß ihrer Propidiumjodidaufnahme abgegrenzt (obere Histogramme). Lebende, PI-negative Zellen waren positiv für EpCAM und CK8 (mittlere Histogramme). Tote Zellen (PI positiv) waren EpCAM-negativ, exprimierten aber CK8 in hoher und heterogener Menge (untere Histogramme). Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines von sechs Patienten. B.) Dargestellt sind die durchschnittlichen CK8-Fluoreszenzen (mean fluorescence intensity) von sechs Zellsuspensionen, die aus Primärtumoren erzeugt wurden, zusammen mit der durchschnittlichen Kontrollfluoreszenz.

**Figur 6:** Zwei-dimensionale Gelelektrophorese von Antigen-Antikörper-Komplexen von *Borrelia burgdorferi* (*B.b.*)-Antigenen und Serumantikörpern von *B.b.* infizierten BALB/c Mäusen. Lebende Borrelien wurden in Lysispuffer aufgenommen und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation pelletiert. Parallel wurden BALB/c Mäuse einmalig mit *B.b.* infiziert und Serum drei Wochen nach Infektion gewonnen. Serum-Antikörper von infizierten Mäusen wurden kovalent auf Sepharose Protein A Kügelchen gekoppelt und zur Immunpräzipitation von *B.b.* Lysaten verwendet. Antigen-Antikörper Komplexe wurden anschließend in einer zwei-dimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE) aufgetrennt (Amersham IPG strips pH 3-10L; SDS-PAGE 13%) und in der Silberfärbung visualisiert.

### Beispiele:

#### I. Anwendung von AMIDA im autologen System

##### **Zelllinien, primäre Tumorzellen, Durchflußzytometrie**

Die GHD-1 Zelllinie wurde aus einer Tumorbiose eines Hypopharynx-Karzinoms erzeugt und in Standard-Zellkulturmedium (DMEM, ergänzt mit 10% fötalem Kalbserum) kultiviert. Einzelzell-Suspensionen aus primären Karzinom-Biopsien des Kopf-Hals-Bereiches wurden wie folgt gewonnen: Die Biopsien wurden zerkleinert und für 2 Stunden bei 37°C auf einem Taumelmischer in DMEM inkubiert, das Kollagenase (2mg/ml; Typ 8 Sigma) und DNase I (0,2mg/ml; Typ IV, Sigma) enthielt. Danach wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und in mit 3% fötalem Kalbsserum ergänztem PBS für die nachfolgende Immunfärbung und Durchflußzytometrie-Analyse resuspendiert. Nicht-permeabilisierte Zellen ( $5 \times 10^5$  pro Probe) wurden mit dem menschlichen CK8-spezifischen Antikörper 1E8 (Hiss Diagnostics, Deutschland) zwei Stunden lang auf Eis inkubiert, in PBS, das 3% fötales Kalbsserum enthielt, gewaschen und mit FITC-markiertem sekundärem Antikörper (1 Stunde, auf Eis) gefärbt. Die Analyse wurde unter Verwendung eines FACScalibur-Gerätes durchgeführt (Becton Dickinson, Deutschland). Alternativ wurden die Zellen fixiert (1% Paraformaldehyd, 10 Minuten) und permeabilisiert (Triton 0,2%, 20 Minuten), bevor sie gefärbt wurden.

Bei allen Experimenten wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt um vitalen/intakte und permeabilisierte Zellen eingegrenzen.

### **Immunpräzipitation, 2D-Gelelektrophorese und Massen-Spektrometrie.**

Biopsien von primären Karzinomen wurden zerkleinert und unter Verwendung eines 100µm Zell-Filters (Falcon) homogenisiert. Die Zellen wurden einmal in PBS gewaschen. Primärtumor-Zellen oder GHD-1 Zellen ( $1 \times 10^7$  Zellen) wurden in hypotonem Puffer, der 10mM HEPES (pH7,9), 10mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mM EGTA und 0,5mM DTT enthielt, für 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden dann mit einer 25G Kanüle mechanisch zerkleinert und die Teilchenfraktion abzentrifugiert (3000g; 4°C). Der die zytoplasmatische Fraktion repräsentierende Überstand wurde mit 1% Triton und Protease-Inhibitoren versetzt und das Pellet (Membranfraktion) in einem dreifachen Volumen PBS resuspendiert, das 1% Triton und Protease-Inhibitoren enthielt. Die Immunpräzipitation wurde mit Sepharose-Perlen, die mit einem anti-humanen IgG3-Antikörper (nur im Falle von GHD-1 Lysaten) vorbeschichtet waren und Patientenseren (über Nacht, 4°C, Taumelmischer) durchgeführt. Danach wurden die Perlen umfassend in 50mM Tris-Puffer gewaschen, in 2D-Lysepuffer resuspendiert (11M Urea, 4% CHAPS, 1% DTT, 2,5mM EDTA und 2,5mM EGTA) und bei 42000g zentrifugiert (1 Stunde, 4°C). Die Proteine im Überstand wurden durch isoelektrische Fokussierung und Verwendung von immobilisierten pH-Gradienten pH 3-10 oder 4-7 (IPG-Streifen, Amersham) getrennt und gemäß ihrem Molekulargewicht in einem 12,5 – 13% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie- oder Silberfärbung visualisiert, die Proteine wurden isoliert, mit Trypsin verdaut (2,5ng/µl; Promega) und in einem MALDI-ToF Massenspektrometer (Bruker) analysiert. Die entsprechenden Proteine wurde unter Verwendung der Mascot Science-Datenbank identifiziert.

### **Isolierung und Identifizierung von Tumorantigenen in primären Karzinomzellen durch autologes Serum**

Die vorliegende Erfindung stellt ein System dar, das zur Isolierung und Identifizierung von Antigenen entwickelt wurde, die beispielsweise in primären Tumorzellen exprimiert werden, und die Ziele für eine humorale Immunreaktion sind. Um diese Identifizierung durchzuführen, wurde zunächst eine Einzelzellsuspension aus einer Biopsie eines primären Hypopharynx-Karzinoms erzeugt. Danach wurden die Zellen lysiert und die Proteine gewonnen (s.o.). Die Lysate wurden für 3h mit Sepharose Protein A-Perlen inkubiert, um unspezifisch

bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Autologe Serum-Antikörper wurden auf Sepharose Protein A-Perlen geschichtet und für die Immunpräzipitation (IP) der Tumorprotein-Lysate verwendet. Die immunpräzipitierten Proteine wurden in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE) gemäß ihrem isoelektrischen Punkt und Molekulargewicht aufgetrennt. Die nachfolgenden Kontroll-IPs wurden parallel analysiert: (i) Perlen, die nur mit Serum beschichtet waren, (ii) Lysate von autologen Normalzellen (hier Leukozyten), die mit den selben Serum-Antikörpern immunpräzipitiert wurden, und (iii) das Proteinlysate wurde mit unbehandelten Sepharose-Perlen inkubiert und immunpräzipitiert, um Proteine zu definieren, die unspezifisch an die Sepharose-Perlen banden. Proteinspots, die ausschließlich in den immunpräzipitierten Tumorklysaten nachzuweisen waren, wurden aus dem Gel ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und durch MALDI-ToF Massenspektrometrie und nachfolgende Recherche in der wissenschaftlichen Datenbank Mascot untersucht und identifiziert. Dabei wurden das Heat Shock Cognate Protein 70 (Hsc70), das Glukose-regulierte Protein 78 (Grp78, ebenfalls bekannt als BiP) und die Keratine 8 und 9 (CK8, CK9) als Targets für eine humorale Immunität identifiziert.

#### **Die Behandlung von Patienten mit einem Karzinom des Kopf-Halsbereiches mit dem bispezifischen Antikörper BiUII: Charakterisierung der induzierten humoralen Anti-Tumorreaktion durch Anwendung von AMIDA**

Obwohl sich die chirurgischen Techniken als auch die Strahlen- und Chemotherapie über die letzten Jahrzehnte verbessern ließen, haben Patienten, die an einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Halsbereiches leiden, nach wie vor eine schlechte klinische Prognose. Es wurden und werden daher hauptsächlich adjuvante immunologische Therapien entwickelt mit dem Ziel, die Lebenserwartung dieser Patienten zu erhöhen und ihre Lebensqualität zu verbessern. Ein viel versprechender Ansatz beruht auf der Aktivierung des Immunsystems in vivo über bispezifische Antikörper, die Tumorzellen mit Immuneffektorzellen vernetzen, was zur Aktivierung dieser Immunzellen und so zum Absterben der Tumorzellen führen kann (Lindhofer, H., et al., Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. J Immunol, 1995. 155: pp. 219-25.; Zeidler, R., et al., Simultaneous Activation of T Cells and Accessory Cells by a New Class of Intact Bispecific Antibody Results in Efficient Tumor Cell Killing, Journal of Immunology, 1999. 163: pp. 1246-1252; Zeidler, R., et al., The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells

and induces direct phagocytosis of tumour cells. British Journal of Cancer, 2000. 83: pp. 261-266; Zeidler et al., TNF $\alpha$  contributes to the antitumor activity of a bispecific, trifunctional antibody, Anticancer Research, in press). BiUII ist ein solcher bispezifischer Antikörper, der in einer klinischen Phase I/II-Studie an Patienten mit Hypopharynx-Karzinomen getestet wurde. Von diesen Patienten wurden vor und nach der Therapie Seren gesammelt und Tumorbiospien gewonnen, um daraus Tumorzelllinien zu erzeugen. Dabei konnte beim Vergleich von prä- mit post-Therapieseren des Patienten GHD-1 die Induktion einer tumorspezifischen humoralen Immunreaktion in einer durchflußzytometrischen Analyse nachgewiesen werden. Die BiUII-Therapie induzierte in diesem Patienten eine starke humorale Immunreaktion gegen die autologe Tumorzelllinie, wie sich an der Anwesenheit von Autoantikörpern der Subklasse IgG3 im post-Therapieserum nachweisen ließ, die an die autologen Tumorzellen banden. Im Gegensatz hierzu wurde keine Erhöhung der Antikörperbindung an autologe Lymphozyten oder Monozyten beobachtet (Figur 1). Somit hatte die BiUII-Behandlung eine gesteigerte tumorspezifische humorale Reaktion zur Folge.

AMIDA wurde bei Patient GHD-1 wie folgt durchgeführt: Prä- und post-Therapieseren wurden getrennt auf Sepharose-A- $\alpha$ IgG3-Perlen geschichtet und mit lysierten Membranfraktionen autologer GHD-1 Zellen inkubiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden durch 2D-PAGE getrennt, nach tryptischem Verdau durch Massenspektrometrie analysiert und unter Verwendung der Mascot Science Protein-Datenbank identifiziert. Der Zweck dieses Experiments war zweifach: Zuerst, die BiUII-induzierte humorale Immunreaktion zu charakterisieren, und zweitens, AMIDA unter Bedingungen anzuwenden, bei denen eine humorale Immunantwort nachgewiesen worden war. AMIDA-Screening bei Patient GHD-1 führte zur differentiellen Immunpräzipitierung von Proteinen, die sich im 2D-PAGE als 9 verschiedene Proteinspots darstellten. D.h. im post-Therapieserum des Patienten waren Antikörper gegen Proteine vorhanden, die im prä-Therapieserum noch nicht vorhanden waren. Diese differentiell präzipitierten Proteine sind zusammen mit ihren geschätzten Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten in Tabelle 1 aufgelistet. Die Proteinspots 1 bis 4 erwiesen sich jeweils als humanes Zytokeratin 8 (CK8; wahrscheinlich unterschiedlich modifizierte Formen davon). CK8 ist ein zytoplasmatisches Protein, das in einschichtigen Epithelien und einigen Arten von Karzinomen exprimiert wird (Southgate, 1999, 13) und das intrazellulär, als Heterodimer mit CK18, intermediäre Filamente bildet. CK8 hat ein Molekulargewicht (MW) von ca. 53 kDa und einen berechneten isoelektrischen Punkt (pI) von 5,36, was mit dem MW und



pI übereinstimmt, wie sie aus den AMIDA-Ergebnissen geschätzt wurden. Die Proteinspots 5, 6 und 7 wurden als menschliche Immunglobulin (Ig)-Lambda und Ig-Kappa-Ketten identifiziert, ein Ergebnis, das zusätzlich die Induktion einer humoralen Reaktion im Anschluss an die BiUII-Therapie unterstreicht. Bei den beiden verbleibenden Spots 8 und 9 handelt es sich um Proteine, für die kein Eintrag in der Datenbank existiert.

### **Zelloberflächenexpression von CK8 in Karzinomlinien und primären Tumorzellen**

Zelluläre Proteine können von Antikörpern auf intakten Zellen eigentlich nur dann erkannt werden, wenn sie sich auf der Zelloberfläche befinden. Da es sich bei CK8 eigentlich um ein streng intrazelluläres Protein handelt, weist die Immunpräzipitierung von CK8 aus einem Proteinlysate der autologen Tumorzellen durch Autoantikörper auf die ektopische, nämlich Oberflächenexpression von CK8 auf diesen Zellen hin. In Folgeexperimenten konzentrierten wir uns daher auf die Charakterisierung dieser aberranten Zelloberflächenexpression von CK8. Hierzu wurden zuerst unpermeabilisierte GHD-1 Zellen mit einem CK8-spezifischen Antikörper in Kombination mit einem FITC-konjugierten sekundären Antikörper gefärbt und die Zelloberflächenexpression von CK8 anschließend in einem FACScalibur Durchflußzytometer bestimmt. Dabei war stets eine schwache, aber beständige Expression von CK8 an der Oberfläche von lebenden und nicht-permeabilisierten GHD-1 Zellen nachweisbar. Die Menge an Membran-ständigem CK8 repräsentierte eine geringere Fraktion im Vergleich zu zytoplasmatischem CK8, wie es in permeabilisierten Zellen detektierbar war (Figur 3a). Überdies konnten wir die Expression von CK8 auf einer Reihe von Kopf-, Hals-, Zervix-, Brust- und Kolonkarzinom-Zelllinien in der Durchflußzytometrie mit spezifischen Antikörpern nachweisen: Neun von elf Karzinomzelllinien exprimierten CK8 auf ihrer Oberfläche (Figur 3b). Die durch die adenoviralen Onkogene E1A und E1B transformierte, humane embryonale Nierenepithelzelllinie HEK293 (Graham et al., Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J General Virology*, 1977, Vol 36, pp. 59-74.) wurde als Kontrolle verwendet, wobei auf der Oberfläche von HEK293-Zellen kein CK8 nachgewiesen werden konnte. Auch in Kontrollexperimenten mit einem Antikörper gegen ein weiteres, streng intrazelluläres Protein (Epidermales Fettsäure-Bindungsprotein, E-FABP) konnte keine unspezifische Färbung an der Zelloberfläche festgestellt werden, obwohl E-FABP intrazellulär stark exprimiert wurde (Daten nicht dargestellt). Zusätzlich wurde das CK8-Färbemuster der Karzinomzelllinien FaDu und PCI-1 durch Immunhistochemie und Immunfluoreszenz bestimmt, indem nicht-permeabilisierte

Zellen mit einem CK8-spezifischen Antikörper angefärbt wurden. Hierbei ergaben sich punktförmige Färbemuster mit hohen lokalen Konzentrationen von CK8 an den Plasmamembranen (Figur 4). In Doppel-Färbungsexperimenten mit einem Antikörper gegen das membrangebundene pan-Karzinomantigen EpCAM konnte ein überlappendes Färbemuster beobachtet werden, was die Membranlokalisierung von CK8 zusätzlich bestätigt (Daten nicht dargestellt).

Um unsere Ergebnisse auch in vivo zu validieren, wurde die aberrante Expression von CK8 auf der Oberfläche von primären Karzinomzellen untersucht. Hierzu wurden aus sechs frisch isolierten primären Tumorbiopsien des Kopf-Hals-Bereiches Einzelzellsuspensionen hergestellt und mit CK8-spezifischen Antikörpern angefärbt. Da solche Biopsien neben den Tumorzellen selbst zusätzlich normale Zellen, wie Immunzellen, enthalten, wurden die Tumorzellen durch einen Antikörper gegen das Karzinom-assoziierte Antigen EpCAM nachgewiesen. Parallel hierzu wurde durch die Zugabe von Propidiumiodid (PI) die Vitalität der Zellen definiert. In diesen Versuchen zeigte sich, dass CK8 ausschließlich auf der Plasmamembran intakter EpCAM positiver Zellen stark (tu-1, tu-2, tu-6), moderat (tu-5) oder schwach (tu-3, tu-4; Figur 5) exprimiert wurde. Auf EpCAM-negativen Zellen, die in diesen Biopsien vorhanden waren, konnte membranständiges CK8 nicht nachgewiesen werden. Tote Zellen wurden anhand der Aufnahme von PI definiert und zeigten ein starkes und heterogenes CK8-Färbemuster, was wahrscheinlich eine zytoplasmatische Färbung von CK8 in toten Zellen widerspiegelt, wie sie auch in permeabilisierten Zelllinien beobachtet wurde. Zusammengefasst erlauben die dargestellten Ergebnisse den Schluss, dass CK8 in Plattenepithelkarzinomen eine ektopische Expression auf der Zelloberfläche erfährt, während eine solche Expression bei Normalzellen nicht zu beobachten ist.

### **Zusammenfassung**

Hierin wird die Identifizierung von Hsc70, Grp78, Zytokeratin 8 und 9 und zweier weiterer Proteine unbekannter Funktion als Ziele für eine humorale Reaktion bei Kopf- und Halskarzinompatienten über eine neue Technik, AMIDA, beschrieben. Die humorale Reaktion, die von Tumorzellen in Patienten hervorgerufen wird, wurde benutzt, um mit Hilfe dieser Technologie Tumor-assoziierte Proteine zu isolieren und zu charakterisieren. Die Expression von CK8 auf der Zelloberfläche von Karzinomzellen wurde im vorhergehenden Absatz bereits ausführlich beschrieben. Tatsächlich wurde über die Zelloberflächenexpression von CK8 für

Brustkarzinomzellen berichtet, wo es als ein Membranrezeptor für Plasminogen und dessen Aktivator (tissue type plasminogen activator, tPA) dient (Hembrough, 1996; Cell-surface cytokeratin 8 is the major plasminogen receptor on breast cancer cells and is required for the accelerated activation of cell-associated plasminogen by tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 271 (41), 25684-91 und Hembrough et. al., 1995 A cytokeratin 8-like protein with plasminogen-binding activity is present on the external surfaces of hepatocytes, HepG2 cells and breast carcinoma cell lines. *J Cell Sci* 108 (3), 1071-82). Es wird angenommen, dass CK8 die Erzeugung eines „Proteasesystems“ an der Membran vermittelt, das Tumorzellen dazu benutzen könnten, um in das umgebende Gewebe zu invadieren und dieses umgestalten. Diese Resultate stimmen mit Daten überein, die über die Zelloberflächenexpression von CK1 und CK8 auf Brustkarzinomen berichten. Von weit größerer Bedeutung war die Validierung der Ergebnisse im Kontext von primären, frisch isolierten Tumorzellen. Sechs Biopsien von Hypopharynx-Plattenepithelkarzinomen wurden bezüglich der Zelloberflächenexpression von CK8 untersucht: Alle erwiesen sich als positiv, wenn auch (wie zu erwarten) in unterschiedlicher Stärke (Figur 5). Somit handelt es sich bei der Expression von CK8 auf der Plasmamembran von Karzinomzellen weder um ein Artefakt kultivierter Zelllinien noch um einen Fehler im Nachweissystem. Dieser klare und eindeutige Nachweis bekräftigt vielmehr das Potential des hier vorgestellten Verfahrens. Da Karzinomzelllinien unterschiedlichen Ursprungs (Kolon, Zervix, Brust, Kopf und Hals) CK8 auf ihren Oberflächen exprimieren, liegt es nahe, dass auch CK8-Antikörper nicht nur (wie nachgewiesen) bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Kopf-Halsbereiches, sondern auch bei anderen Karzinompatienten vorhanden sein dürften.

In weiterführenden Experimenten wurden aus einem Zervix-Karzinom und einem Hypopharynx-Karzinom mittlerweile 50 differentiell exprimierte Proteinspots isoliert, die Gegenstand derzeitiger Forschungsarbeiten sind.

Spot	Geschätztes MW (kDa)	Geschätzter pI (pH)	Protein
1	50	5,4	menschliches CK8
2	50	5,2	menschliches CK8
3	50	5,1	menschliches CK8
4	50	5,0	menschliches CK8
5	25	5,8	menschliche Ig-Lambda-Kette (Vorstufe)
6	20	6,2	menschliche IgG Kappa-Kette

7	20	6,2	menschliche IgG Kappa-Kette
8	80	4,3	KIAA1273
9	160	6,5	KIAA0373

**Tabelle 1:** Geschätzte Molekulargewichte und isoelektrische Punkte von Proteinen, die aus zehn Proteinspots isoliert wurden, die reproduzierbar bei AMIDA-Screenings mit Material aus dem Patienten GHD-1 durchgeführt wurden.

## II. Anwendung von AMIDA im xenogenen System:

### Borrelia burgdorferi und die Lyme Krankheit:

*Borrelia burgdorferi* (B.b.), das kausale Agens der Lyme Borreliose, ist ein Gram-negatives Bakterium. B.b. wird durch Zeckenbiß (*Ixodes ricinus*) übertragen und kann, im Falle einer fehlenden oder mangelhaften Behandlung, eine persistierende und chronisch verlaufende Arthritis verursachen (Lyme Arthritis). Außerdem kann es zu chronischen Infektionen des Herzes und Hirns kommen, die eine Karditis bzw. Encephallitis zur Folge haben (Steere, 1997; Steere, 2001).

Mithilfe von Mausmodellen konnte die Pathogenese der Lyme Borreliose studiert werden. Ein Zusammenhang zwischen dem Haplotyp des Haupthistokompatibilitätskomplexes von Mäusen (H2) und deren Suszeptibilität gegenüber einer Borrelien Infektion wurde dabei festgestellt (Schaible et al., 1991). Dieser Zusammenhang besteht auch beim Menschen: bestimmte MHC-Haplotypen sind mit einem chronischen Verlauf der Lyme Borreliose assoziiert.

### Die humorale Antwort in Mäusen nach Infektion mit B.b.:

Die Immunantwort gegen B.b. und die molekulare Grundlage für eine Suszeptibilität sind nur unvollständig verstanden. Die Antwort der Helfer- (CD4+) T Zellen ist ein entscheidender Faktor in der Pathogenese der Lyme Arthritis (LA): die Aktivierung einer Th1 Antwort, die gekennzeichnet ist durch die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN-gamma, führt zur Induktion der LA. Die Aktivierung von Typ 2 Helfer T-Zellen, und damit die Bildung von u.a. IL4, hat einen schützenden Effekt bei der Pathogenese der LA (Keane-

Myers and Nickell, 1995a; Keane-Myers and Nickell, 1995b; Matyniak et al., 1995). IL4 ist ein essentielles Zytokin bei der Aktivierung und Reifung von B-Zellen, sodass die Induktion einer humoralen Antwort gegen *B.b.* vermutet und experimentell auch bestätigt werden konnte. Es sind nur wenige der Reaktivitäten gegen *B.b.* in Mäusen charakterisiert, wie die beiden Membranproteinen Osp C und Osp17 (Pohl-Koppe et al., 2001), obschon protektive Antikörper gebildet werden (McKisic and Barthold, 2000).

#### Identifizierung von Zielantigenen der humoralen Antwort gegen *B.b.* mittels AMIDA:

Mithilfe der AMIDA Technologie wurde die humorale Antwort in resistenten BALB/c Mäusen vor bzw. nach *B.b.* Infektion untersucht. Lebende Borrelien ( $3 \times 10^8$ ) wurden in Lysispuffer (PBS, 1% Triton X-100) aufgenommen und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation pelletiert. Parallel wurden BALB/c Mäuse einmalig mit  $1 \times 10^8$  *B.b.* infiziert und Serum drei Wochen nach Infektion gewonnen. Serum-Antikörper von infizierten Mäusen wurden kovalent auf Sepharose Protein A Kügelchen gekoppelt und zur Immunpräzipitation von *B.b.* Lysaten verwendet (200µl Serum + 50µl Sepharose Protein A). Antigen-Antikörper Komplexe wurden anschließend in einer zwei-dimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE) aufgetrennt (Amersham IPG strips pH 3-10L; SDS-PAGE 13%) und in der Silberfärbung visualisiert (siehe Fig. 6). Immunpräzipitierte Proteine wurden aus den 2D-PAGE geschnitten, mit Trypsin behandelt und in einer MALDI-ToF Massenspektrometrie analysiert. Proteine, die unspezifisch an die Sepharose Protein A Kügelchen gebunden waren, wurden in einem Kontrollgel visualisiert und bei der Auswahl nicht berücksichtigt. Auf diese Weise konnte eine *B.b.*-spezifische humorale Antwort gegen *Flagellin* (accession number: FLLYB3), das *konservierte hypothetische integrale Membranprotein BB0616* (accession number: G70220) und das *exportierte Protein A (eppA)*, accession number: G70176) nach Infektion in Mäusen nachgewiesen werden.

### **III. Anwendung von AMIDA im allogenen System**

#### Identifizierung von Antigenen einer permanenten humanen Karzinomzelllinie mit Hilfe von Serumantikörpern per AMIDA:

Eines der möglichen Anwendungsgebiete von AMIDA ist die Identifizierung von Markern zur Detektion und Diagnostik von Erkrankungen. An einen solchen „Biomarker“ sind verschiedene Bedingungen zu stellen, wie Häufigkeit und Spezifität. Das bedeutet, der Marker (etwa Cytokeratin-8 spezifische Antikörper bei Tumorerkrankungen) soll bei möglichst vielen Tumorpatienten, gleichzeitig aber bei möglichst wenig gesunden Kontrollpersonen vorhanden sein. Um diese Fragestellung anzugehen, haben wir unsere AMIDA Technologie auch im allogenen System angewendet. Dabei war es uns wichtig, ein System zu etablieren, das einfach und reproduzierbar ist. Ein solches sind beispielsweise immortalisierte Zelllinien (etwa Tumorzelllinien), die eine homogene Population darstellen und permanent verfügbar sind.

Hierzu wurden von  $1 \times 10^7$  Zellen einer permanenten humanen Karzinomzelllinie (FaDu, ATCC-Nr. HTB-43) ein Lysat (in PBS, 1% Triton X-100) hergestellt und die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation pelletiert. Serum-Antikörper eines Tumorpatienten wurden zwischenzeitlich kovalent auf Sepharose Protein A Kügelchen gekoppelt und zur Immunpräzipitation von *FaDu*-Lysaten verwendet (200µl Serum + 50µl Sepharose Protein A). Antigen-Antikörper Komplexe wurden anschließend in einer zwei-dimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE) aufgetrennt (Amersham IPG strips pH 3-10; SDS-PAGE 13%) und durch Silberfärbung visualisiert (siehe Abb. 1). Immunpräzipitierte Proteine wurden aus den 2D-PAGE geschnitten, mit Trypsin behandelt und in einer MALDI-ToF Massenspektrometrie analysiert. Proteine, die unspezifisch an die Sepharose Protein A Kügelchen gebunden waren, wurden in einem Kontrollgel visualisiert und bei der Auswahl nicht berücksichtigt. Auf diese Weise konnten im Serum des Patienten Antikörper nachgewiesen werden, die *FaDu*-Antigene erkennen und die sich somit auch zur Isolierung und Identifizierung allogener Antigene per AMIDA eignen.

Bei dem oben beschriebenen Experiment gelang es uns so, folgende FaDu-Antigene zu isolieren und zu identifizieren:

<b>Protein</b>	<b>Referenz</b>
Tropomyosin alpha	Zytoskelett-bindendes Protein (J. Muscle Res Cell Motil 2001; 22:5-49)
BiP (Ig HC-binding protein) Grp78 (glucose-regulated protein 78)	<ul style="list-style-type: none"><li>• auf der Oberfläche von Rhabdomyosarkomen vorhanden.</li><li>• Autoantikörper bei Rheumatischer Arthritis vorhanden.</li></ul>
Cytokeratin 8	<ul style="list-style-type: none"><li>• auf der Oberfläche von Brustkrebszellen vorhanden (JBC 271:25684 (1996))</li><li>• per AMIDA bereits im autologen System identifiziert</li></ul>

## Literatur:

- Keane-Myers, A. and Nickell, S.P. (1995a) Role of IL-4 and IFN-gamma in modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. *J Immunol*, **155**, 2020-2028.
- Keane-Myers, A. and Nickell, S.P. (1995b) T cell subset-dependent modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. *J Immunol*, **154**, 1770-1776.
- Matyniak, J.E., Reiner, S.L., Schaible, U.E., Kramer, M.D., Wallich, R., Tran, T. and Simon, M.M. (1995) T helper phenotype and genetic susceptibility in experimental Lyme disease. *J Exp Med*, **181**, 1251-1254. occurrence of *B. burgdorferi*-induced arthritis suggest a critical role of T cells in the development of the disease in mice.
- McKisic, M.D. and Barthold, S.W. (2000) T-cell-independent responses to *Borrelia burgdorferi* are critical for protective immunity and resolution of lyme disease. *Infect Immun*, **68**, 5190-5197.
- Pohl-Koppe, A., Kaunicnik, A. and Wilske, B. (2001) Characterization of the cellular and humoral immune response to outer surface protein C and outer surface protein 17 in children with early disseminated Lyme borreliosis. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, **189**, 193-200.
- Schaible, U.E., Kramer, M.D., Wallich, R., Tran, T. and Simon, M.M. (1991) Experimental *Borrelia burgdorferi* infection in inbred mouse strains: antibody response and association of H-2 genes with resistance and susceptibility to development of arthritis. *Eur J Immunol*, **21**, 2397-2405.
- Steere, A.C. (1997) Diagnosis and treatment of Lyme arthritis. *Med Clin North Am*, **81**, 179-194.
- Steere, A.C. (2001) Lyme disease. *N Engl J Med*, **345**, 115-125.



Patentansprüche:

1. Verfahren zum Auffinden von Antigenen mit den nachfolgenden Schritten:
  - a) Herstellen eines Proteinlysats aus einem zu untersuchenden Zellmaterial eines Spenders;
  - b) Inkubieren des Proteinlysats mit allogenem, xenogenem und/oder autologem Serum, Aszites und/oder Pleuralflüssigkeit, die jeweils Antikörper enthalten, die im Laufe einer humoralen Immunantwort oder einer Autoimmunantwort auf die Antigene gebildet wurden, um eine spezifische Bindung der Antikörper an die Antigene des Proteinlysats zu erhalten;
  - c) Abtrennen der Antigen-Antikörper-Komplexe;
  - d) Nachweisen der mit den Antikörpern spezifisch gebundenen Antigene.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt b) zusätzlich Antikörper zugegeben werden, die gegen Immunglobuline des Spenders gerichtet sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem es sich bei den Antigenen um Tumorantigene oder Antigene, die mit Autoimmunkrankheiten, bakteriellen, viralen oder parasitären Infektionen assoziiert sind, handelt.

4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 3,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
vor dem Inkubationsschritt das Proteinlysate einer Fraktionierung unterworfen wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Fraktionierung eine Trennung in Membrananteile und Zytoplasmaanteile umfasst.
6. Verfahren nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Fraktionierung eine Trennung des Zellmaterials in subzelluläre Kompartimente umfasst.
7. Verfahren nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
eine Fraktionierung nach Proteingröße mittels Größenausschlußsäulen erfolgt.
8. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Antikörper an ein Trägermaterial gebunden vorliegen.
9. Verfahren nach Anspruch 8,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
als Trägermaterial Sepharose, Sepharose Protein A, Sepharose Protein G, Agarose Protein A oder Agarose Protein G eingesetzt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
das Proteinlysate mit dem jeweils verwendeten Trägermaterial vorinkubiert wird.
11. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Antikörper an das Trägermaterial kovalent gebunden vorliegen.

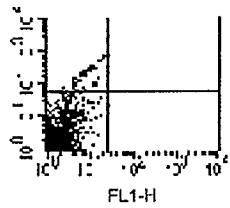
12. Verfahren nach Anspruch 11,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die kovalente Bindung durch Bildung von Amidbindungen zwischen Amino- und Carboxylgruppen der Proteine oder die Bildung von Disulfidbrücken aus zwei SH-Gruppen erfolgt.
13. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche 7-12,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Abtrennung der Antigen-Antikörperkomplexe mittels Zentrifugation oder Sedimentation erfolgt.
14. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die Abtrennung der Antigen-Antikörperkomplexe mittels Isolierung der Antikörper durch Protein A bzw. G beschichtete Säulen erfolgt.
15. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
der Nachweis der Antigene das Auftrennen der abgetrennten Komplexe durch elektrophoretische Methoden umfasst.
16. Verfahren nach Anspruch 15,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
eine zweidimensionale Elektrophorese eingesetzt wird.
17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16,  
dadurch gekennzeichnet, dass die Antigene nach der Gel-Elektrophorese mit Farbstoffen, z.B. Coomassie-Blau, Silber, Ponceau-Rot, oder mit fluoreszierenden oder lumineszierenden Reagenzien behandelt werden.
18. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüchen,  
dadurch gekennzeichnet, dass

die Zellen vor der Lyse mit radioaktiven Reagenzien inkubiert werden.

19. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 16-18, dadurch gekennzeichnet, dass nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung die Antigene von Interesse ausgeschnitten, einem Protease-Verdau unterzogen und mittels Massenspektrometrie analysiert werden.
20. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 16-18, dadurch gekennzeichnet, dass nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung die Antigene von Interesse ausgeschnitten, einem Protease -Verdau unterzogen und sequenziert werden.
21. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 16-20, dadurch gekennzeichnet, dass die Antigene nach der Elektrophorese auf eine Nitrocellulose- oder eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)- Membrane übertragen werden und anschließend erst von der Membran isoliert werden.
22. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Nachweis der Antigene einen Vergleich der gefundenen Antigene mit Kontrollproben, insbesondere aus gesundem Zellmaterial, und/oder mit dem Serum alleine bzw. Ly-sat alleine umfasst.
23. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Spender des Zellmaterials ein Säugetier, insbesondere ein Mensch, ein Primat oder ein Nagetier, bevorzugt Maus, Ratte, Hamster oder Kaninchen, oder ein infektiöser Organismus, bevorzugt ein Virus, ein Bakterium oder ein Parasit, eingesetzt wird.

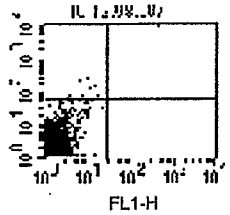
24. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass  
das Serum, Aszites und/oder Pleuralflüssigkeit aus einem Säugetier, insbesondere einem Menschen, einem Primaten oder einem Nagetier, bevorzugt Maus, Ratte, Hamster oder Kaninchen, gewonnen wurde.

a



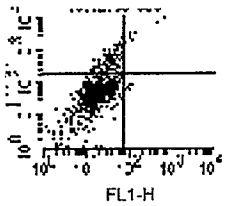
Quad	% Gated
UL	2.23
UR	0.18
LL	97.57
LR	0.02

Lymphozyten



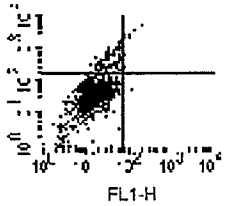
Quad	% Gated
UL	0.34
UR	0.07
LL	99.60
LR	0.00

b



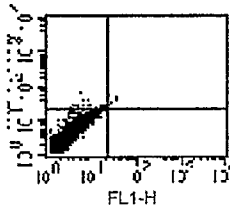
Quad	% Gated
UL	13.77
UR	1.07
LL	84.81
LR	0.35

Monocyten



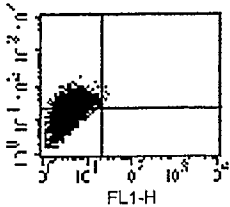
Quad	% Gated
UL	8.07
UR	0.99
LL	90.47
LR	0.47

c



Quad	% Gated
UL	0.95
UR	0.22
LL	98.82
LR	0.00

Tumorzellen



Quad	% Gated
UL	39.48
UR	0.20
LL	60.32
LR	0.00

Figur 1

2/7

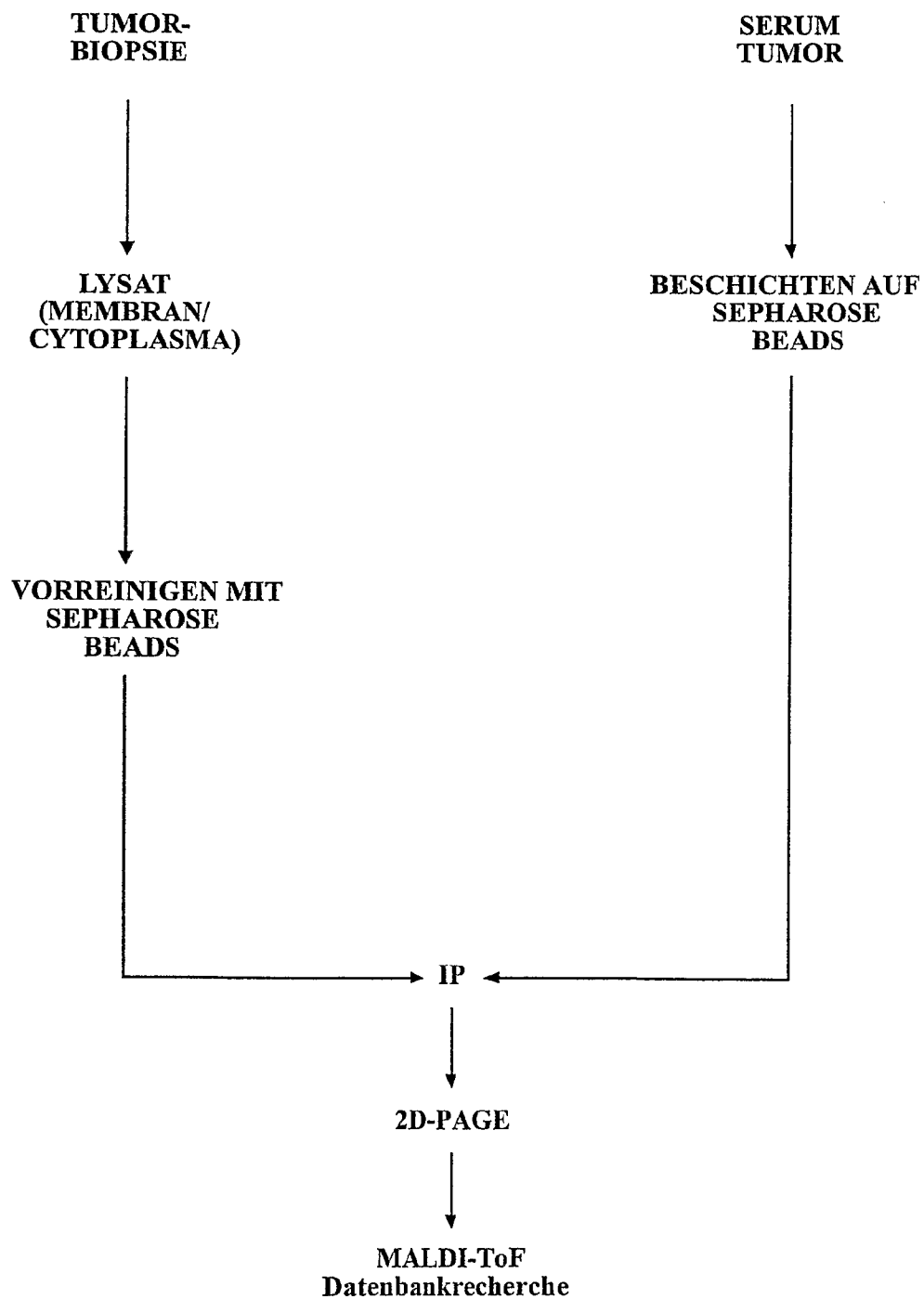


Fig. 2

3/7

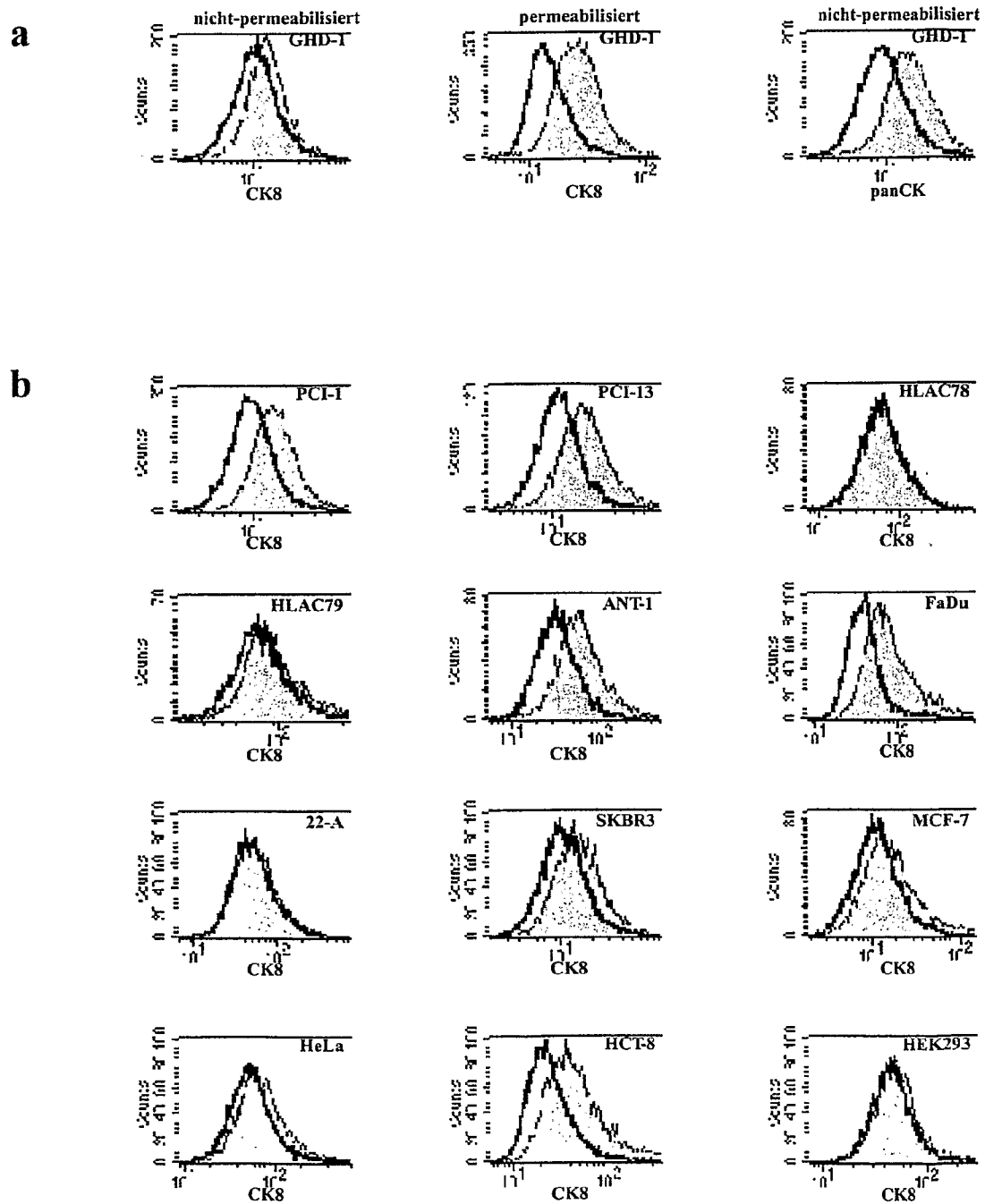
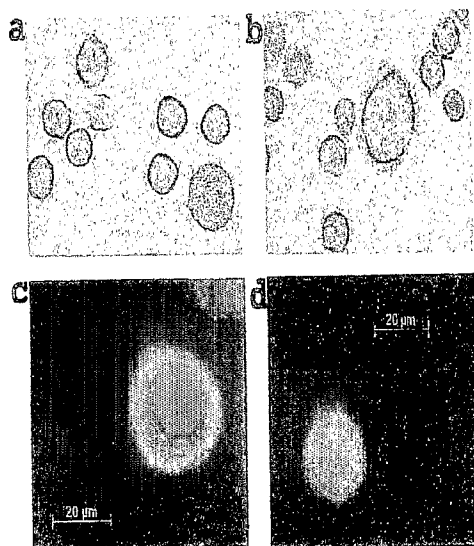


Fig. 3





Figur 4

A.)

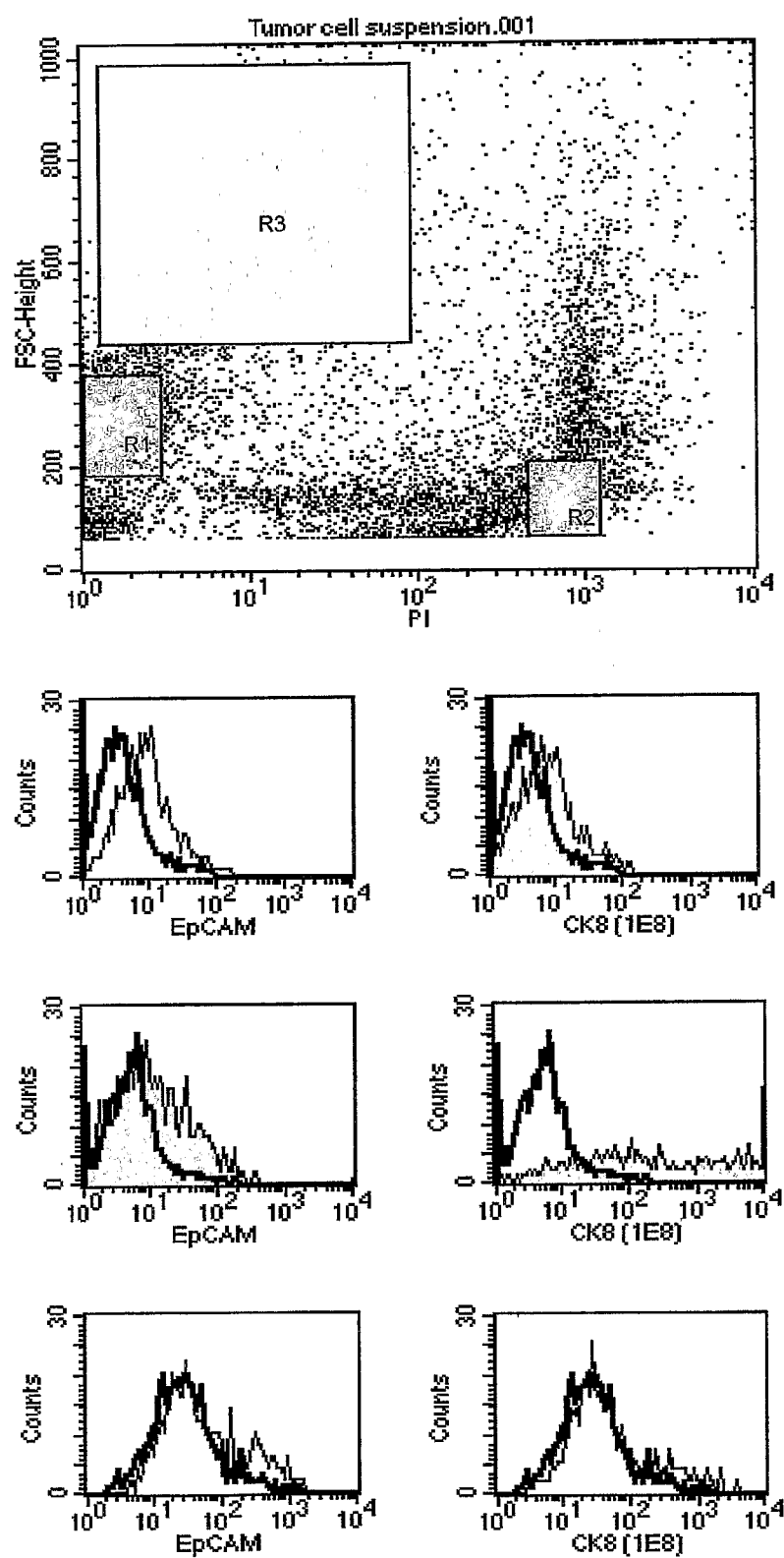
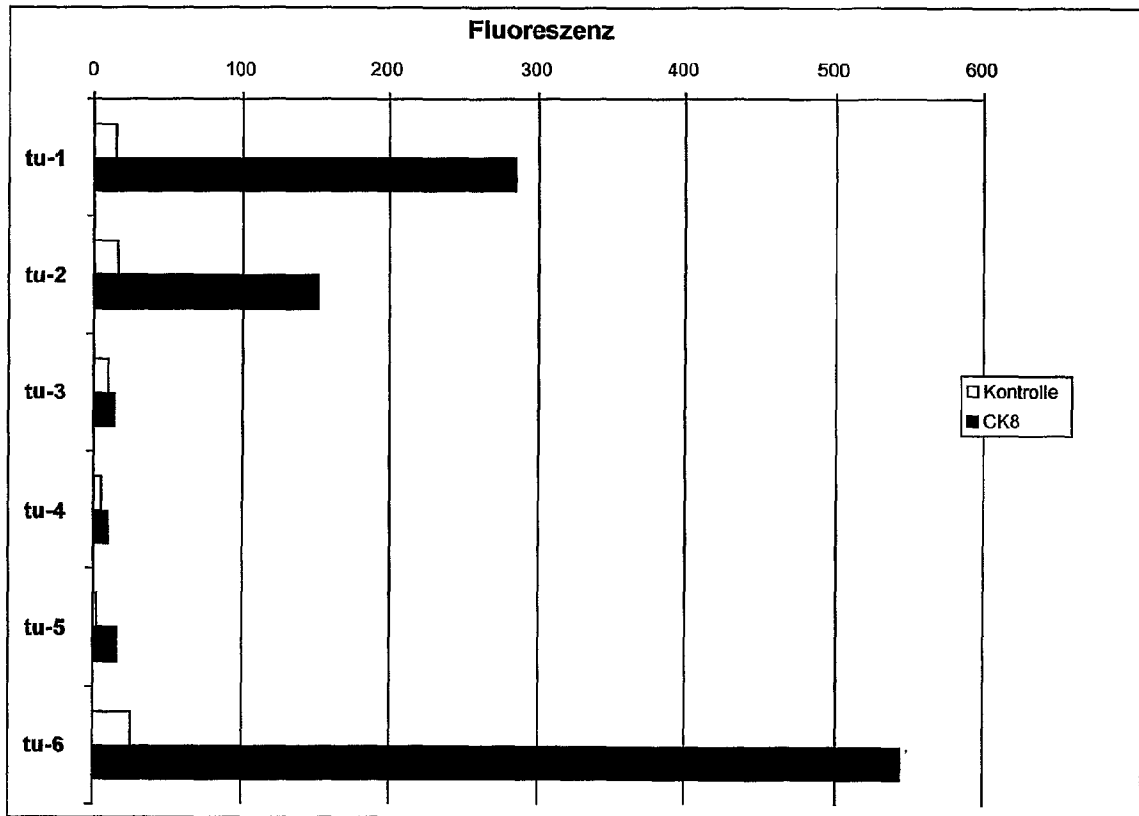
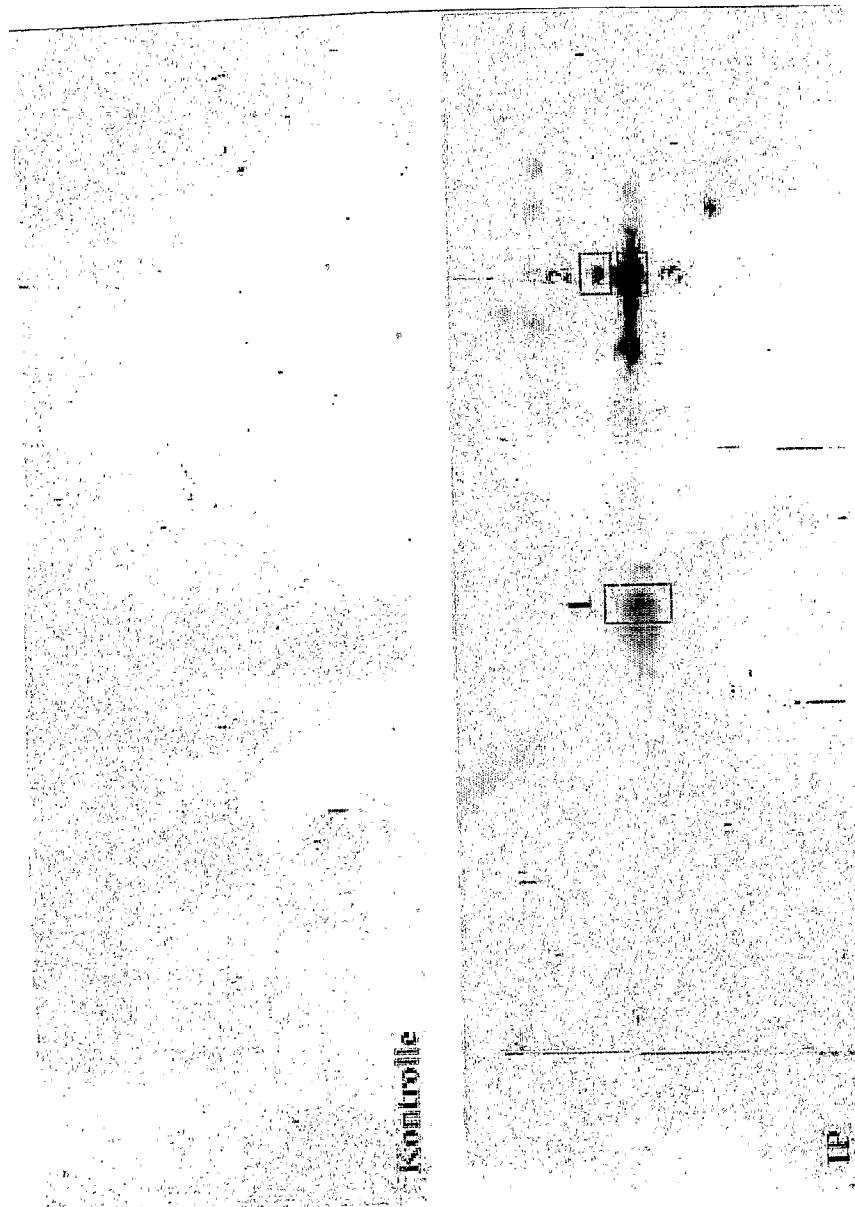


Figure 5

6/7

B.)





FIGUR 6